

⑫ 公表特許公報(A)

平5-503989

⑬ 公表 平成5年(1993)6月24日

⑭ Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	審査請求 予備審査請求	未請求 有	部門(区分)	6(1)
G 01 N 27/447 B 01 D 57/02 // C 07 K 3/14		7726-4D 7731-4H 7235-2J 7235-2J	G 01 N 27/26	3 1 5 Z 3 3 1 Z		(全 13 頁)

⑮ 発明の名称 キヤピラリー電気泳動のための流速制御表面荷電コーティング

⑯ 特 願 平2-515884

⑰ 出 願 平2(1990)11月6日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)5月6日

⑲ 国際出願 PCT/US90/06435

⑳ 国際公開番号 WO91/06851

㉑ 国際公開日 平3(1991)5月16日

優先権主張 ㉒ 1989年11月6日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 432,061

㉕ 発 明 者 ウィクトロウイツ, ジョン イ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95129 サン ジョーズ, フ
ー オレスト, グレン ドライブ 5145㉖ 出 願 人 アブライド バイオシステムズ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター シテ
インコーポレイテッド イ, リンカーン センター ドライブ 850

㉗ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

㉘ 指 定 国 A T (広域特許), B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), D K (広域特許), E S (広域特許), F R
(広域特許), G B (広域特許), G R (広域特許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S
E (広域特許)

請求の範囲

1. 荷電した表面層をもつキャピラリーチューブ中に選択された電気浸透流の特性を達成する方法において、その方法がアノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1 のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引き入れるとき、チューブの表面荷電を変えることができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する、

各工程から成る方法。

2. 前記モニターが、間隔をあけた時間間隔で、前記チューブにこのチューブを移動する流体マーカーの複数のパルスを導入する工程を含み、この流体マーカーはこのマーカー溶液を含むチューブ中に流体のバンドの電気浸透流速をモニターするために使用することができる、請求項1記載の方法。

3. 前記チューブが負に荷電した表面シラン基を有する石英ガラスチューブであり、前記化合物が規則的に間隔をあけて配置された、荷電アミン基を含むポリマーである、請求項1記載の方法。

4. ポリマーが4級アミンの疎水性ポリマーである、請求項1記載の方法。

5. ポリマーが、 $N(R_2)^+- (CH_2)_n - N(R_3)^+$ 、式中の $n = 2 \sim 10$ 、 R は H またはアルキルまたはアリール基である、形態のポリマー

の群から選ばれる、請求項4記載の方法。

6. ポリマーがポリブレンである、請求項5記載の方法。

7. チューブが正に荷電したアミン基を有する石英ガラスチューブであり、前記化合物がポリスルホン酸、ポリカルボン酸、ポリホスホン酸、およびポリリン酸ポリマーからなる群から選ばれる負に荷電したポリマーである、請求項1記載の方法。

8. 表面荷電基が静電的に表面壁に結合している荷電コーティング剤の分子に部分的に依存しており、前記化合物が、この化合物をチューブを通して引き入れるとき、表面壁からコーティング剤の分子を除去するように働く、請求項1記載の方法。

9. 化合物が、この化合物をチューブに引き入れて通すとき、チューブの表面壁に静電的に、そしてそれ自身に疎水的に結合するように働く荷電ポリマー化合物であり、前記引き入れが、表面壁の荷電が中性となり最初の電気浸透流の方向で電気浸透流が止むまで、この最初の電気浸透流の方向に化合物を引き入れることを含み、さらに向かい合った方向で、チューブ内の電気浸透流が選択された速度に達するまで同じ最初の電気浸透流の方向にチューブを通して荷電化合物を引き入れることを含む、請求項1記載の方法。

10. 前記キャピラリーチューブ壁が負の荷電をもち、荷電したポリマー化合物が疎水性の4級アミンポリマーである、請求項9記載の方法。

11. 選択された電気泳動媒体において異なる寸法および/または荷電の性質を有する少なくとも2個の高分子種を分離する際に使用するためのキャピラリー電気泳動チューブを調整する際に使用するため、電気浸透流の特性が、選択された媒体中のキャピラリー電気泳動によって達成され得る高分子間の分離の程度を高める

ように選ばれる、請求項1記載の方法。

12. 正に荷電した蛋白質を分離するために、前記表面壁が負に荷電した基を有し、前記化合物が、この化合物をチューブに引出して通すとき、チューブの表面壁に静電的に、そしてそれ自身に疎水的に結合するように働く疎水性のポリアミンポリマーであり、前記引き入れが、表面壁の負の荷電が少なくとも実質的に中性となるまで、電気浸透流の最初の方でチューブ内に化合物を引き入れることを含む、請求項11記載の方法。

13. 前記引出しが最初の方での電気浸透流が止むまで継続され、そしてさらに、向かい合った方向において、チューブ内の電気浸透流が選択された速度に達するまで前記最初の方でチューブを通して荷電した化合物を引き入れることを含む、請求項12記載の方法。

14. 核酸種を分離するために使用するため、前記表面壁が負に荷電基を有し、前記化合物が疎水性のポリアミンポリマーであり、さらに、分離することになっている少なくとも1つの種が表面壁のポリマー化合物に結合していないイオン強度で、電気泳動媒体中の核酸種を電気泳動的に分離することを含む、請求項11記載の方法。

15. 電気泳動媒体のイオン強度がキャピラリーの表面壁に結合するポリマーに異なる核酸種を好ましく結合するようなイオン強度である、請求項14記載の方法。

16. さらに、焼くかまたは化学的手段によって脱水することによって、化合物を壁に結合することを含む、請求項1記載の方法。

17. キャピラリー壁の表面に共有結合的に結合した荷電した基の選択された密度を有するキャピラリーチューブを生成するのに使用するため、前記化合物が表面壁の基に共有結合により結合する

ことができ、さらに表面壁に共有結合により化合物を結合することを含む、請求項1記載の方法。

18. 荷電した表面基と選択された電気浸透流の特性を有するキャピラリーチューブが、

アノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引き入れるとき、チューブの表面荷電を変えることができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する、

各工程によって調整されたキャピラリーチューブ。

19. 前記チューブが負に荷電した表面シラン基を有する石英ガラスチューブであり、前記化合物が規則的に間隔をあけた、荷電したアミン基を含むポリマーである、請求項18記載のチューブ。

20. ポリマーが4級アミンの、疎水性ポリマーである請求項19記載のチューブ。

明 細 書

キャピラリー電気泳動のための流速制御表面荷電コーティング

1. 発明の技術分野

本発明はキャピラリー電気泳動に関するものであり、そして特に、生体分子の電気泳動分離を高めるため、キャピラリーチューブ中で制御された電気浸透流速を達成するための方法に関するものである。

2. 参考文献

コーヘン エイ エスら、アナリティカル ケミストリー、59:1021 (1987)。

コーヘン エイ エスら、ジャーナル オブ クロマトグラフィ、458:323 (1988)。

コンプトン エス ダブリュら、バイオテクニクス、6(5)432 (1988)。

ヘリン ビイ ジェイ、ジャーナル オブ コロイド インターフェイス サイエンス 115(1):46 (1987)。

カスパー ティ ジェイら、ジャーナル オブ クロマトグラフィ、458:303 (1988)。

ラウエル エイチ エイチ、アナリティカル ケミストリー、58:166 (1985)。

マッコーミック アール ダブリュ、アナリティカル ケミストリー、60(21):2322 (1988)。

3. 発明の背景

キャピラリー電気泳動 (CE) はDNA種、蛋白質、ペプチド、および派生したアミノ酸を含む、種々の生体分子の迅速な分別の

ために提案された (コーヘン、1987、1988、コンプトン、カスパー)。代表的には、この方法は内径が約50~200 ミクロンであり、その長さが約10~100cm またはそれ以上である、溶融シリカキャピラリーチューブを用いる。

通常のCE方法では、キャピラリーチューブは電気泳動媒体で充填され、少ない試料容量をチューブの一端に引き入れ、そして電場をチューブを横切って位置させて試料を媒体を介して引き出すようにする。電気泳動媒体は非流動性ポリマーまたは、一定のタイプのCE分別に使用するため、ゲル物質または他のタイプのCE分別に適している流動体物質であることができる。蛋白質種の異なる荷電密度に基づいた、流動性の電気泳動媒体における蛋白質の電気泳動分離が、報告されている (ラウエル)。CEの技術を核酸分別に応用する際に、種は高い同じ荷電密度に分別され、高分離の分別はゲル化したマトリックス媒体を必要としないが、また高分子量のポリマーを含む流動性の電気泳動媒体内で達成されることが見出された ("対抗移動キャピラリー電気泳動による核酸分別" に対する共有のUS特許出願、第390,631号、1989年8月7日出願)。

CEが流動性の電気泳動媒体を使用して行われるとき、媒体それ自体は電極の一つに向かってキャピラリーチューブを介して大量の流体の移動を受けることができる。この電気浸透流はキャピラリー壁界面で生ずる荷電遮蔽効果に起因する。溶融シリカチューブの場合には、負に荷電したシラン基を有し、荷電遮蔽が表面壁付近で電気泳動媒体中の正に荷電したイオンの円筒状の "シェル" を生じる。このシェルは、順番に、大量の流動性媒体に流体の正に荷電したカラムの特性を帯びさせて、シェルの厚さ (デバイ長) に依存する電気浸透流速にてカソードの電極に向かって移

動する。チューブを通る流動性媒体の電気浸透流の速度もまた電場の強度、および媒体の粘度に依存する。

上に引用した特許出願に詳述しているように、電気浸透流速は2またはそれ以上の類似の種の間の分離を改善するために最適化することができる重要な変数を与えることができる。特に、CEが、電気浸透流および分離すべき種の移動を向かい合った方向にある状態の下に行う場合、一方向で、向かい合った方向の種の電気泳動移動速度にほぼ等しい電気浸透流速にすることによって、分離のための有効なカラム長を極端に長くすることができる。

これ迄は、電気浸透流速を調整または制御する試みは限られていた。一つの提案では、電気泳動媒体のpHを十分に低く、例えば、pH 4以下として、荷電表面基に陽子を加え、このようにして表面荷電密度を減らすことで行われた。この提案は低いpHの変性効果が生じる得る多くの蛋白質には適用できない。

また、電気泳動緩衝液に、表面荷電をマスクする為ある平衡定数にて表面に結合できる荷電試薬を含ませ、このようにして電気浸透流を減らすことも提案されている。この提案は分離される種に結合し、従ってこれらの種の荷電密度を変える荷電した試薬の問題によってきびしく制限される。また、結合する化合物の濃度を試行錯誤により検査しなければならない。

中性または正に荷電した試薬を用いて荷電した表面基を電子対を共有して誘導することによって電気浸透流を減少または除去するための試みもまた報告されている。この提案は、まず所望の電気浸透流を達成するための反応条件を検査することが難しく、また反応が不可逆であるため、即ち、チューブを他の選択された電気浸透流速に対してさらに再被覆することができないので、広く採用されなかった。

別の一般的実施例では、キャピラリーチューブは正に荷電したアミン基をもつガラスチューブであり、荷電を変える化合物は負に荷電したポリマー、例えばポリスルホン酸、ポリカルボン酸、ポリホスホン酸、またはポリリン酸のポリマーである。

荷電した疎水性ポリマー、例えば疎水性ポリアミンを使用する場合、その方法は逆方向に電気浸透流を生じる選択された段階のオーバーコーティングを行うことができる。この方法では、ポリマーをまずチューブに通して表面壁の荷電が中性となって最初の方の電気浸透流が止むまで電気浸透流の最初の方に引き入れる。その後、反対側の方向でチューブ内の電気浸透流が選択された速度に達する迄、化合物を引き入れてチューブ中に同じ方向に通す。この方法は特に、(a)チューブ壁の正味の正の荷電が正でありそのために壁表面に静電気の蛋白質の結合が妨げられ、(b)電気浸透の逆方向の速度が蛋白質分離を最適にするように選択されるので、正に荷電した蛋白質を分離するために有用である。

本方法はさらにキャピラリー壁の表面に選択された密度の共有結合した荷電基をもち、壁表面の荷電をマスクするためおよびチューブ壁の反応性の化学基に共有結合するために、化学基をもつ化合物を用いて、キャピラリーチューブを生成するための工程を含むことができる。所望の電気浸透流を達成した後、被覆されたチューブを、表面壁に共有的に化合物を結合するために有効なカップリング剤で処理する。

他の面においては、本発明は本発明の方法によって成形されたCEチューブを含む。このチューブは(a)所定の電気泳動媒体中で、選択された電気浸透流、および(b)荷電したポリマー剤のコーティングによって特徴づけられる。一つの好適例では、荷

4. 発明の概要

従って本発明の一般的な目的のひとつは、CEチューブ中に選択された電気浸透流速を達成するための方法を提供することである。

さらに特定の目的は、容易に実施でき、蛋白質と核酸の両方のCE分別と両立でき、CEチューブ中に可逆的または不可逆的表面荷電密度になるような方法で行うことができる方法を提供することである。

本発明は、一面においては荷電表面基をもつキャピラリーチューブ中に選択された電気浸透流の特性を達成する方法を含む。チューブはアノードとカソードの電解質貯蔵器の間に連結し、電場を貯蔵器を越えてチューブ内に電気浸透流を生成するように配置する。電気浸透流の間に、チューブの表面荷電を変えることができる化合物をチューブに引き入れて通し、チューブ内の電気浸透流速をモニターする。前記モニターすることによって決定されるように、チューブ中に所望の電気浸透流速を達成するまで、化合物を引き続き中に引き入れて通す。

チューブを通る電気浸透流速は、時間間隔をあけて、一連の流体マーカーのパルスを、チューブに導入することによってモニターすることが好ましく、このマーカーのチューブの通過を使用してマーカー溶液を含むチューブ中の流体のバンドの電気浸透流速をモニターすることができる。

一つの一般的な好適例では、チューブは負に荷電した表面シラン基をもつ溶融シリカチューブであり、荷電を変える化合物が規則正しく間隔をあけて、荷電したアミン基、好ましくは4級アミンの荷電した基をもつ疎水性ポリマーを含むポリマー、例えばポリマーポリブレンである。

電したポリマー剤は疎水性のポリ4級アミンポリマーである。

本発明のこれらの目的および特徴およびその他の目的および特徴は、以下の本発明の詳細な説明を図面と共に読むと一層完全に明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は本発明の方法を実施する際に使用するキャピラリー電気泳動システムの概略図であり；

図2はパルス電圧と一定電圧のモードを同時に操作するために設計されたキャピラリー電気泳動システムの概略図であり；

図3はキャピラリー電気泳動チューブの拡大断片図であり、右から左への方向に電気浸透流(e)を示し、左から右への方向にフラグメント移動(m₁、m₂、m₃)を示しており；

図4は流速を制御した表面荷電コーティング(FCS)の基本を示す図であり；

図5はポリブレンを用いたコーティング時間の関数として電気浸透流速のプロットを示す図であり；

図6は0.0005%ポリブレンを用いたコーティング時間の関数として電気浸透流速のプロットを示す図であり；

図7は2種のポリブレン濃度のポリブレンを用いたコーティング時間の関数として電気浸透流速のプロットを示す図であり；

図8はスベルミンを用いたコーティング時間の関数として電気浸透流速のプロットを示す図であり；

図9はドデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを用いたコーティング時間の関数として電気浸透流速のプロットを示す図であり；

図10はポリブレンの不存在での乳酸デヒドロゲナーゼのCE電気泳動図であり；

図11はポリブレンで被覆したCEチューブにおける乳酸デヒドロゲナーゼのCE電気泳動図であり;

図12はポリブレン被覆キャピラリーを用いるヒストンH4の5つのアセチル化形態の分析を示し;

図13は2種のRNase T1の分離を示し;

図14はキャピラリーをポリブレンで被覆したときのNaClの不存在でのDNAのキャピラリー電気泳動工程から発生した電気泳動図であり;

図15はキャピラリーをポリブレンで被覆したときの10mMのNaClの存在でのDNAのキャピラリー電気泳動工程から発生した電気泳動図であり;

図16はキャピラリーをポリブレンで被覆したときの20mMのNaClの存在でのDNAのキャピラリー電気泳動工程から発生した電気泳動図であり;

図17は塩の不存在で2種のRNase T1のキャピラリー電気泳動工程から発生した電気泳動図であり;

図18は30mMのNaClの存在での2種のRNase T1の分析を示す図である。

発明の詳細な説明

1. キャピラリー電気泳動システム

図1は本発明の流速制御表面荷電コーティング(FCS C)方法を行うため、並びにFCS C方法によって調製されたチューブを用いる電気泳動分離を行うためのキャピラリー電気泳動(CE)システム20の概略図である。このシステムは長さが好ましくは約10~200cm、一般的には約100cm以下、内径が好ましくは約25~200 μ m(ミクロン)、一般的には約50 μ mのキャピラリーチューブ22を含む。図に示した例では、チューブを水平位置に支持し

の間でチューブを洗い流すための溶液を含む追加の貯蔵器を備えることができる。二種以上の溶液が単一の電気泳動分別法において用いられる。

22bで示される、チューブの反対側のカソード端部は、カソード貯蔵器32内にシールされており、図に示すように、貯蔵器に含まれるカソード電解液34に浸す。貯蔵器内の第二のチューブ38は、(例えば、洗浄液、マーカー溶液、および電気泳動緩衝液のような)液体をチューブを介して引き出し、貯蔵器30の高分子試料物質をチューブに装填するために、微細に調整された真空装置(図には示していない)に連結する。

システムの高圧電源40は、2つの貯蔵器間に選択された電位を印加するために、図に示すようにカソードとアノードの貯蔵器に連結する。電力供給導線を、それぞれ、アノード貯蔵器とカソード貯蔵器の白金電極41、42に連結する。電源は電極を渡る定電圧(DC)を、好ましくは5~50KVに設定した電圧で、印加するように設計することができる。また代わりに、あるいは加えて、電源を貯蔵器間に選択された周波数のパルス電圧を印加するように設計することができる。一般に、キャピラリーチューブが短いほど、印加できる電界強度が高くなり、電気泳動分離が迅速になる。

パルスした電圧モードで操作するとき、電源は好ましくは約50HzからkHzの範囲まで調整できる周波数で、また約10~30KVのrms電圧出力で方形波パルスを出力する。MHzの範囲でも、さらに高いパルス周波数を、いくつかの応用のために合わせることができる。

図1に示したシステムの説明を完成させるには、システムの検出器44を、チューブ中の光学検出ゾーン46を運って移動する核酸フラグメントを光学的にモニターするため、チューブのカソード

下方に端部を曲げている。

チューブの内側表面は化学基が好ましくは約4~9のpHで負または正に荷電している化学基をもつ。表面の化学基は、負電荷を与える表面にシラン基を有する溶融シリカチューブの場合のように、キャピラリー材料の固有の性質であってもよい。また代わりに、あるいは加えて、キャピラリー壁を、4級アミンのような、化学基のアタッチメントのための既知の誘導剤を用いて、または既知の正に荷電した表面コーティング剤を用いて処理することができる。好ましいキャピラリーチューブのひとつは内径が50 μ mの溶融シリカチューブであり、ポリミクロ・テクノロジー(フェニックス、AZ)から入手できる。

さらに一般的には、キャピラリーチューブは緩衝液のカラムを支持できる任意のチューブまたは導管であることができ、好ましくはカラム厚は200 μ mまたはそれ以下である。例えば、チューブはガラススライド等の形をした導管の形状をとり、負に荷電した表面基をもつことができる。

システム内のアノードの貯蔵器26は、チューブ端部を横切る電場を印加して電気浸透流によってチューブを運って引き出される電解液28(セクションII)を含む。22aで示されたチューブのアノード端部を、図に示すように、電気泳動の間、溶液に浸す。

システム内の貯蔵器30は、ECS C法の間に使用するため、マーカー溶液を含むことができ、または電気泳動分離の間に、分離すべき分子の試料を含むことができる。好ましくはマーカーまたは試料物質は電解液または水に溶解する。2つのアノード貯蔵器は、チューブのアノード下端を貯蔵液に浸すことができる位置に置くために、カルセル等に支持することができる。図には示していないが、カルセルは電気泳動の走行または異なる溶液

端部付近に設置する。検出器はUV吸収検出用および/または蛍光検出用に設計することができる。UV吸収は、例えばアブライド・バイオシステムス(フォスター市、カリフォルニア)によって、フローセルをキャピラリーホルダーと置き換えて、改良されたクラウス783UV吸収検出器を用いて、240~280nmで行うことができる。蛍光検出は好ましくは、下記に述べるように、核酸フラグメントと関連する蛍光標識によって、約240~500nmに調整できる選ばれた励起波長で行われる。蛍光検出器の一例は、ヒューレット・パッカード(パロ・アルト、カリフォルニア)から入手でき、キャピラリーチューブ検出用に上述のように改良されたHP1046A検出器である。この検出器は電気泳動ピークを記録するため積分器/プロッタ45に連結する。

図2に示したような検出器を用いて、FCS C法の間に測定された電気浸透流速は、チューブの上流端部(端部22a)から、チューブの下流端部付近の、検出器によってマーカーが認められるチューブ内の地点まで移行するマーカーバンドに必要な時間を計算することによって決定される。この方法で検出された電気浸透流速は従って、マーカーが導かれる時間およびマーカーが検出される時間での瞬間流速の平均を示す。このシステムは、直接検出器の上流に配置して、瞬間流速を決定し、T字チューブを運るマーカーをチューブ内に周期的に導入できるように変更することもできる。

代表的なFCS C方法では、実施例1に詳述した条件を用いて、貯蔵器32を真空にしてキャピラリーチューブに適当な洗浄とすすぎの溶液を引き出し、このチューブを完全に洗浄する。次いでチューブに若干量の電解質緩衝液を流し、少量の、一般には1~10ナノリットルの試料物質をアノードチューブ端部に装填する。

端部チューブ端に表面荷電を変えるための化合物を導入して、チューブ内の電気浸透流を設定し、カソードとアノードの貯蔵器の間に電圧をかける。

図2はパルスおよび定電圧モードの両方で操作できる電気泳動システム50の断面図を示す。システムのキャピラリーチューブ52は、56で示した検出ゾーンの付近の上流で小さいクリアランスブレード54を有する。ブレードのどちらかの側のチューブ部はチューブの内外に電気泳動により移動する有孔のガラススリーブ58によって連結されている。チューブの連結部は適当な電気泳動溶液62を充填した貯蔵器60内に密封する。貯蔵器の接地電極64は負の側が適当なカソード貯蔵器と連結されているパルス電圧電源66の高圧側に連結する。接地電極64は負の側が適当なアノード貯蔵器と連結されているDC電源68の高圧側に連結する。

II. 電気浸透流

このセクションでは電気浸透流の現象を述べる。この現象は、電気泳動チューブ内に所望の表面荷電コーティングを達成するため、本発明のFCS方法と、試料種間の電気泳動分離を最適にするため、試料物質の電気泳動分離の両方で活用される。

図3はキャピラリー電気泳動チューブ70の拡大断面図を示す。図に見られるように、“-”の符号で示した、チューブ内壁の負に荷電した基が、チューブ内の流体カラムの周りに正に荷電したシェルを基本的に形成する。ポリマー溶液中で正に荷電したイオンによって遮蔽されている。壁面で比較的動かない正のイオンのシェルの厚さは切断距離として知られている。正の電荷と内側バルク相の電荷が分布するこの外側シェルは電気二重層と呼ばれ、正の電荷の外側シェルとバルク媒体との間の電位の差であるゼータ電位を特徴とする。

相対的差は、順着に、 ϵ を変えることによって選択的に制御することができる。例えば、 ϵ を m_1 に近づけることによって、ベクトル μ_1 をかなり小さくすることができ、従って F_1 を他の2つの種から容易に分離することができる。同様に、 ϵ を m_2 に近づけることによって、ベクトル μ_2 をかなり小さくすることができ、 F_2 を容易に F_1 から分離できる。

改良された蛋白質と核酸の分離を達成するために、選択された電気浸透流速を使用することは以下にさらに詳細に述べるであろう。

III. 流速制御表面荷電コーティング (FCS/C)

FCS/Cの原理は図4に示される。負(-)と正(+)の符号に関連した線は電極を示す。2つの貯蔵器を連結する線はキャピラリーを示す。Tはキャピラリーの長さを移動するために必要な時間の合計を示し、 μ は電気浸透流を示す； μ 近くの矢印は電気浸透流を含むベクトルを示す。Tにて、所定の印加電圧に対して、電気浸透流は μ である。正に帯電した物質、例えばポリマーを含む4級アミン(下記に示す)がアノードの貯蔵器に導入され、電圧が印加されると、ある時間T₁にて電気浸透流が μ_1 まで減少する(短い矢印で示した)。キャピラリー壁の荷電の大きさは電気浸透流に直接関係する。走行時間の増加と共に電気浸透流が遅くなるのは、正に帯電した物質によってキャピラリーがコーティングされ、その結果キャピラリー壁の荷電が減少する結果にある(実施例1；図8)。時間T_{1,0.05}でのある地点にて、キャピラリーの全表面荷電が中性となり、電気浸透流 $\mu_{1,0.05}$ はゼロとなるであろう。

正に荷電した若干の物質について流速制御表面荷電コーティングに影響する能力を試験した。図8は、非重合性1級アミンであ

電界の影響下で、(正の電荷のシェルによって囲まれている)媒体中のポリマー溶液のこのカラムは負または低い電位の方向に電気浸透で引き出される。チューブ内の電気浸透流の速度は図中の矢印 ϵ で示される(矢印 ϵ は大きさ ϵ のベクトル及びチューブの軸に沿った方向と考えることができる)。キャピラリーチューブ内の電気泳動流の速度 ϵ は次式で表される：

$$\epsilon = \frac{\epsilon \cdot \xi \cdot E}{\eta}$$

式中の ϵ 、 η 、 ξ 、およびEは、それぞれ、流体の誘電率、その粘度、ゼータ電位、および電界強度である。

ゼータ電位、 ξ は荷電壁表面に印加されるとき、シェルの切断半径に相当する荷電シェルの“内側表面”と荷電壁表面との間の界面の二重層を横切る電位を記述する。電位は従って壁表面の正味の荷電に直接依存し、それぞれ壁の表面荷電密度を増加または減少することによって増加または減少することができる。

図3はまた試料種、例えば図において F_1 、 F_2 、および F_3 で示される3つの核酸種の電気泳動分離をいかにして、本発明によって、選択された電気浸透流速を与えるように、調整されるCEチューブ中で高めることができるかを示している。電気浸透流の速度はここではベクトル ϵ で示され、図では下流方向に大きさ ϵ を示す。3つの核酸種は m_1 、 m_2 、および m_3 で示されるベクトルによって示された速度で反対方向に電気泳動によって移動する。チューブ内のそれぞれの種の正味の移動速度は、それぞれ μ_1 、 μ_2 、および μ_3 で示される二つの向かい合うベクトルの丁度合計である。

3つの種を分離するための能力は3つの移動速度ベクトル μ_1 、 μ_2 、および μ_3 間の差に依存する。これらベクトル間のこれらの

スベルミンを用いたFCS/Cの効果を示す。走行時間の増加と共に電気浸透流($V_{0.05}$)の減少は、示された2つの濃度に対して明らかである(実施例3)。これらの結果の他の重要な特徴は、電気浸透流が走行時間の増加と共にかなり早く平らになることであり、スベルミンを結合したキャピラリー壁と緩衝液中のスベルミンとの間が平衡状態になったことを示している。減少した $V_{0.05}$ の維持は走行する緩衝液中のスベルミンが継続して存在することと緩衝液のイオン強度に依存する。

$V_{0.05}$ に影響する第2の正に荷電した化合物はドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(DTAB)である；非重合性4級アミン。DTABを用いた電気コーティングおよび走行時間の増加に伴う電気浸透流($V_{0.05}$)の減少の結果は、図9に示される濃度に対して明らかである(実施例4)。この図から見られるように、スベルミンを用いた場合に見られたように、DTABは、DTABを結合したキャピラリー壁と緩衝液中の遊離DTABとの間で迅速に平衡に達する。

スベルミンとDTABとの両方で電気コーティングすることはいずれかの化合物を用いる電気浸透流の検査が $V_{0.05}$ の補正のために極狭いウィンドウを与えるという制限がある。電気コーティングのために用いられる第3の正に荷電した物質はヘキサジメスリンブロマイド(ポリブレン)であった。ポリブレンを用いて得られた電気コーティングデータは0.0005%の濃度に対して図6に示される(実施例2)。ポリブレンは電気コーティング剤のための良い選択を行う2つの非常に重要な特徴をもち、(1)図6に見られるようにポリブレンはスベルミンやDTABのように迅速に平ら(すなわち平衡に達する)にはならない；そして(2)ポリブレンコーティングの反転は広範な洗浄サイクルを必要とし

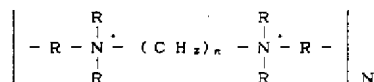
(実施例1参照)、従って緩衝液のイオン強度に対してスベルミンのように敏感ではない。ポリブレンは、しかし、電気泳動緩衝液に依存するある範囲の安定性をもつ。ある程度までポリブレンコーティングの安定性は緩衝液中に存在するイオンに依存する。本発明を支持して行われる実験では、リン酸緩衝液が最も不安定であり、ホウ酸緩衝液がより大きい安定性を与えることを示している。

電気コーティングのために用いられるポリマーはイオン性と疎水性の2つの主なキャピラリー壁との相互作用をもつ。従って、キャピラリー電気泳動における電気浸透流の調整に有用なポリマーの特徴は次のものを含む：

1. 選択のポリマーは多数のイオン結合中心をもつ必要がある。ポリブレンの場合、結合中心は4級アミンである。

2. ポリマーはある程度の疎水性をもつ必要がある。

次の形態のポリマー、 $(NR_2)^+ \cdot (CH_2)_n \cdot (NR_2)^+$ がこの応用に特に適している：



式中のRは側鎖（例えば水素、アルキル、アリール、または官能基）およびNはポリマー中に存在する繰り返し単位の数である。このようなポリマーは4級アミンと壁の負の荷電との間の直接の荷電相互作用、およびさらに荷電遮蔽の結果として生じる壁との疎水性の相互作用をもつ。ポリブレンはキャピラリー壁に荷電をマスクするポリマーの一つである。

実施例2は2種類の濃度のポリブレンを用いるキャピラリーの電気コーティングを記載する；電気浸透流の電気コーティングの

によって電気浸透流の調整はコーティングポリマーの負の荷電の特性によって検量される。

特定の電気浸透流を確立するための条件を容易に選択する能力は研究のための貴重な応用性を示す。例えば、任意の与えられた分離応用に対して、分離を最大にする適当な電圧と電気浸透流の条件を決定することができ（例、実施例5～8）そして次に分離を行うため日常業務として再現性よく使用できる。

さらに、繰り返しの分離応用に対して、例えば臨床設定において、固定した電気浸透流となるように電子対を共有するようにキャピラリーチューブを改変する。これは2つの方法のうち1つで行うことができる。第一は、キャピラリーチューブをポリマー、例えばポリブレンを用いて被覆し、露出した負に荷電したシラン部分を二官能性試薬を用いて活性化し、次いで第二のコーティング剤をカラムに塗布してキャピラリーに二官能性試薬を介して共有結合により結合させることができる。第二は、選択された流速を、ポリマー、例えばポリブレンを用いて確立し、次に例えば、化学的方法によって焼くかまたは脱水して、キャピラリーにポリマーを共有結合によって結合させることができる。あるいは、ポリブレンを改変してキャピラリー壁のシラン基に共有結合することができる基を含むようにする。

IV. 蛋白質キャピラリー電気泳動への応用

A. キャピラリー壁を用いてブロック相互作用物にオーバーコーティング。

蛋白質の分離にキャピラリー電気泳動を応用することが主に制限されるのは、多くの蛋白質が正味の負の荷電を有し、その結果キャピラリー壁のシラン基に強く結合していることである。シラン基に陽子を加え、従って壁の正味の荷電を減らすため低いpH

効果は図7に示される。これらのデータは本発明の重要な特徴を示し、指定された時間に対しポリブレンを用いて電気コーティングすることと、得られた電気浸透流速との間に、正確な関係が存在することが認められる。このような関係は特に、（上記のように）キャピラリー壁との所定のポリブレンの安定な相互作用に価値がある。特定の電気浸透流は、図7に示したように、ポリブレンの所定の濃度に対する検量線から選択することができ、またその流を達成する走行時間を容易に決定することができる。

電気浸透流をチューニングする他の方法は、電気コーティングのための両性イオンの4級アミンの使用である。両性イオン化合物の利点は、 V_{eo} をキャピラリー表面を完全にコーティングすることによって調整されることである。このコーティングの結果、キャピラリー表面に固有の荷電は中性となり、および負の荷電中心の置換は両性イオン化合物中に存在する。他の言葉で言うと、ゼータ電位に寄与して残っている荷電だけが両性イオン化合物内に存在する負の荷電である。例えば、ポリブレンそれ自体は多くの4級アミン-正に荷電した中心をもち、ポリブレンを用いたキャピラリーの表面荷電の完全な中性化は正味の荷電とはならず、 V_{eo} がゼロに減少する。しかしながら、ポリブレン様のポリマーは、R位（上記を参照）の50%で置換された荷電基、例えば炭酸塩、スルホン酸塩をもつコーティングのために使用することができる。キャピラリーの固有表面荷電の全部がポリマーの4級アミン-正の荷電中心によって中性化される範囲まで、キャピラリーがこのポリマーで完全に被覆されるとき、キャピラリー壁の正味の荷電は元の荷電のほぼ2分の1であろう。キャピラリー壁の荷電は今やポリマーによって与えられた負の荷電中心の唯一の結果であり、新しい V_{eo} が確立される。このようなコーティング方法

を用いるこのシステムでは、4以下のpHを必要とするが大抵の蛋白質がこのpHに耐えられないので、容認できる選択ではない。

キャピラリー電気泳動によって正に荷電した蛋白質を分離することが困難なのは、実施例5、図10によって示される。ウサギの筋肉から導いたラクトデヒドロゲナーゼ(LDH)の3つのイソフォームを実施例5に記載した条件下でキャピラリーに装填した；LDHは正味の正の荷電である。図10は装填したLDHが回収されないことを示している。蛋白質が保持される一番ありそうな理由はLDHとキャピラリー壁の間の荷電の相互作用であった。キャピラリー壁の荷電を反転するために、キャピラリーをポリブレンで被覆した。

ポリブレンによる被覆は、電気浸透流、 μ がゼロに減少するまで、選択された濃度でポリブレンを用いて電気コーティングすることによって行われる。この状態は負に荷電した壁が正の荷電と等しい数によって中性化するときを生じる。しかしポリブレンおよびこの種のポリマーを特に電気コーティングに適させる一つの性質は、キャピラリー壁とその荷電相互作用に加えて、疎水性の相互作用を形成するポリマーの能力である。これらの疎水性相互作用はキャピラリー壁並びに既にキャピラリー壁を被覆したポリブレン分子で生じる。電気浸透流をゼロに減らしたのち、さらにコーティングはまず正に荷電したポリマーについてカソードの静電引力に基づいて行われる。キャピラリー壁の正味の荷電が正になると、電気浸透流はそれ自体が反転シアノードの方向に流れる。キャピラリーをさらに被覆するために、電極の極性が反転し、電気浸透流は今やさらにポリブレンを貯蔵器から、キャピラリーを介して引出し、その結果キャピラリー壁が被覆され正味の正の荷電となる。

図11は、図10に対して使用したものと同一条件下で行われたキャピラリー電気泳動の結果を示しているが、この場合にはキャピラリーはポリブレンによってオーバーコーティングされている。図11から認められるように、ポリブレンで被覆したキャピラリーを使用すると、このキャピラリー電気泳動システムは、LDHの3種類のイソフォームを非常に効果的に分離する。

またキャピラリー電気泳動は、試料として、5種類のアセチル化された形態の塩基性の高い蛋白質ヒストンH4を使用して行われた。ポリブレンを用いてキャピラリーをオーバーコーティングしないと、これらの蛋白質はキャピラリーを移行しなかった。他方、ポリブレンで被覆したキャピラリーを電気泳動に使用するとき、システムは5つのアセチル化蛋白質の形態に分割できる(実施例5; 図12)。

キャピラリー電気泳動システムにおいて塩基性蛋白質を分離する能力は、特にほんの少量の蛋白質が入手できるときに、蛋白質の分析のための極端に貴重な技術を提供する。

B. 選択された電気浸透流速を使用する蛋白質のキャピラリー電気泳動。

負に荷電した蛋白質に対してはキャピラリー壁と蛋白質との間に不都合な荷電の相互作用は存在しない。これら蛋白質の分離は、電気浸透流に向かい合った方向にアノードに対して蛋白質の荷電引力と電気浸透流との組合せに基づく; 従って、蛋白質分離を調整するように電気浸透流を調整できることは非常に価値のあることである。上述のように、所定のポリマー濃度に対して引き出される検量線は選択された V_{00} を達成するために必要な条件の決定のために有用な道具である。

負に荷電した蛋白質の分離を達成するために部分コーティング

の使用の1例を図13(実施例6)に示す。キャピラリーを5分間0.001%のポリブレンで予備被覆し、次に、正味の負の荷電であるリボスクレアゼT1(RNase T1)と、リジン置換に対しグルタミンをもつ組換えにより生成した変種の同量の混合物2.5ngを装填した。この変種の置換は野生タイプの種よりも一層正の荷電を有していることに起因する。図13はこの方法を使用して顕著な分離が行われることをはっきりと示している。中性のマーカーはピーク6.57によって、2種のRNase T1は14.26 および15.96によって示されている。

C. 負に荷電した蛋白質のイオン交換キャピラリー電気泳動

部分コーティングを使用して行われる分離の別のタイプは、キャピラリー壁の荷電中心に対して塩と荷電蛋白質との間の競合を含む。この競合は図17と18のRNase T1と変種(上述のもの)に対して示される。キャピラリーはポリブレンで部分被覆して、RNase T1の試料混合物は10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH=5.6)をランニング緩衝液として使用してキャピラリーに装填する(実施例8)。この工程で得られた電気泳動図は図17に示されている; この図ではRNase T1種のいずれも相当するピークがない。最もありそうなのは、ポリブレンとの荷電相互作用の結果としてRNase 種がカラム内に残留していることである。キャピラリーを洗浄して部分的に被覆されたキャピラリーを同じ緩衝液と10mMの塩化ナトリウムに溶解した2つのRNase T1種を用いて装填するとき、2つの種に相当するピークが検出された。塩化ナトリウムの濃度を増やして同じ方法を繰り返した。RNase T1蛋白質の最大収率は30mMのNaClを用いて得られた(図18)。

負に荷電した蛋白質の保持に選択的に作用するこの能力は異なっているイオン特性をもつ蛋白質の分離に対して有効に応用され

る。異なっているイオン特性をもつ蛋白質の混合物を与えると、条件を選択して、1つまたはそれ以上の蛋白質を保持し、他の混合物の蛋白質をキャピラリーを通して移行させ、キャピラリー電気泳動分離を行うことができる。さらにこの技術を応用すると、負に荷電した蛋白質の濃縮とそれに続く分離が行われる; このキャピラリー電気泳動システムの応用は核酸分離に関連して以下に述べる。

V. 核酸キャピラリー電気泳動への応用

核酸の分離のために中性ポリマーを、キャピラリーチューブ中の流体分別媒体となる電気泳動緩衝液に添加する。核酸分離法とさらに電気泳動緩衝液中の中性ポリマーの封入による応用は共有の米国特許出願第390,631号に記載されている。

対向移動キャピラリー電気泳動(CMCE)は負に荷電した核酸の移動によって示すことができる。同時にキャピラリーチューブ中の電解溶液は下流に(カソードの貯蔵器に向かって)電気浸透流によって移動し、負に荷電した核酸フラグメントは溶液に対して反対の方向にアノードの貯蔵器に向かって移動する。フラグメントと中性ポリマー分子との分子相互作用のために、アノードの貯蔵器に向かうフラグメントの移動は、寸法に依存しており、より小さいフラグメントはアノード方向により早く移動する。

核酸のキャピラリー電気泳動分離は蛋白質の分離と同様に電気浸透流に依存しており; 蛋白質について述べたように V_{00} を調整する能力は、またこれらの高分子の分離についても貴重な条件である。核酸の分割のために V_{00} を調整するための有用なアプローチの一つはキャピラリーを両性イオン化合物でコーティングすることである(上記参照)。両性イオン化合物を使用すると、 V_{00} を選択し、核酸とキャピラリー壁との間の荷電反発を維持するこ

とができる。

キャピラリー電気泳動を核酸分離に応用するための他の重要なものはイオン交換現象であり、これは負に荷電した蛋白質に対して上に述べた。実施例7はキャピラリーをポリブレンで部分コーティングすることと、核酸分離の効果を記載している。DNA試料をSB緩衝液中で塩を含ませずに実験するとき、装填したDNA試料に相当するピークは検出されなかった(実施例14)。しかしながら、同じ試料を10mMの塩化ナトリウムの存在で実験するとき、複数のDNA種が分割された(図15); 塩濃度を20mMまで増やすとDNA種がさらに分割された(図16)。負に荷電した蛋白質に関するかぎりでは、塩は、一般のイオン交換現象に生じるポリブレンへの結合のために競合していることが明らかである。

このイオン交換現象は核酸の分離に対して活用できる。核酸種の混合物を与えると、混合物中のより大きい分子をキャピラリー壁に結合して混合物中のより小さい種を一層有効に分割させるように行うことができる。

イオン交換現象の他の重要な応用は生物学的に重要な高分子の希釈溶液を濃縮する能力である; この応用は多くの臨床上の及び研究上の問題に対して重要である。例えば、核酸の希釈溶液の濃縮については、キャピラリーチューブの小さい部分をポリブレンで被覆し、被覆された領域に対して正味の正の荷電となるようにする。次に希釈試料をキャピラリーに装填し、電圧を印加する。核酸は束縛され、正に荷電した領域においてこの領域とのイオンの相互作用によって蓄積される。次にキャピラリーを核酸を引き離すように十分なイオンの力のランニング緩衝液を用いて処理する。この引き離しは高塩緩衝液の正面の小さいゾーンで起こる。

引き離された核酸は次に、上述のような、対向移動キャピラリー電気泳動によって、キャピラリーの長さの残りについて分離される。高分子を濃縮する方法は、同様に負に荷電した蛋白質に应用することができる。

次の実施例は種々の分離方法および応用を本発明に従って記載しているが、その範囲を制限するつもりのもではない。

実施例 1

ポリブレンコーティングレベルの開散としての電気浸透流の変化

キャピラリー電気泳動は ABI モデル 270 キャピラリー電気泳動システムを用いて行った。このシステムは電圧を 30 kV までセットできる組込み高電圧 DC 電源を含む。システムに使用したキャピラリーチューブはポリマイクロテクノロジー (フェニックス, AZ) から入手した長さ 72 cm、内径 50 μ m、外径 350 μ m の溶融シリカキャピラリーチューブである。

電気浸透流速 (V_{oe}) を示すために用いたマーカーは中性化合物、酸化メシチルであり、これは 200 nm で強い吸収を示す。電気泳動システムは実験を通して約 25 kV (約 350 V/cm) の電圧設定で行った。UV 検出はキャピラリーチューブ検出用に設計されたカラムス 783 UV 検出器を用いた。検出器出力信号はスペクトロフジクス Sp4400 積分器/プロッターで積分しプロットした。

新しいキャピラリー表面はキャピラリーを連続して 5 ~ 10 キャピラリー容量の 1.0 NaOH、3 ~ 5 容量の H_2O 、3 ~ 5 容量の 0.1 N HCl、3 ~ 5 容量の H_2O 、および最後に 3 ~ 5 容量の 5 mM NaP 0. (pH 7.0) 緩衝液を用いて洗浄して定期的に再生させた。溶液をキャピラリーからカソード端部を真空にして吸い出した。

一般に、近似の緩衝液を用いて平衡にした後、2 ~ 5 nI の中性マーカー (酸化メシチル) をカソード端部を真空にしてキャピ

ラリーに注入した；マーカーは電気浸透流を測定するために使用する。マーカーの注入は続いて 2 ~ 5 nI (2 ~ 10 ng) の蛋白質試料を注入することによって行った；マーカーまたは試料のいずれかをサイクルから省略することができる。次に適当な電圧 (30 kV まで) をキャピラリーの両端部にかけて印加し UV 検出器によって分離をモニターすることができる。電気コーティングは緩衝液とポリブレン (ヘキサジメスリンプロマイド；アブライド・バイオシステムズ、フォスター市、CA から入手できる) を含むアノード貯蔵器からポリブレンを含まず緩衝液を含むカソードの貯蔵器まで電圧を印加して行った。

25 kV の 1 分間のパルスによって連続してマーカー (2.5 nI) をキャピラリーに注入すると、連続するマーカーのピークが移動し、アノードの緩衝液とポリブレンがキャピラリーを通り最後に検出器を通過した。200 nm での吸収をモニターし、マーカーの平均速度と、従って電気浸透流を概算した。これらの条件下ではポリブレンの吸収を検出できなかった。

総計の走行時間は 70 分であり、最終の約 50 分間は図 5 に示されている；20 分から 70 分までは電気泳動図の下部に 5 分間隔で示されている。アノードの貯蔵器中のポリブレンの濃度は 0.0005 % であった。約 24 分でポリブレンはキャピラリーチューブの全長を移動した。電気浸透流速が遅くなることは中性のマーカーのピーク間の距離が増加することから明らかであり、これは走行が進行し、キャピラリーが次第にポリブレンによってさらに被覆されることになる。

実施例 2

電気浸透流速の検査

実施例 1 で使用したものと同一キャピラリー電気泳動条件を用

いた。電気浸透流速 (cm/分 で示される V_{oe}) は、横断した距離と、パルスが UV 検出器を通過するまで中性マーカーを注入してからの経過した時間に基づいて計算した。計算された V_{oe} を経過した全走行時間に対してプロットした；その結果は図 6 に示す。0.0005 % の濃度でのポリブレンは時間 0 でアノードの貯蔵器に存在した。

0.001 % の濃度でポリブレンを使用する電気コーティングもまた行った。($V_{oe} + 1$) の \ln を 0.0005 % と 0.001 % のポリブレン濃度について全経過走行時間に対してプロットした (図 7)。図 7 に見ることができるようにこれらのポリブレン濃度ではコーティング時間、ポリマー濃度および電気浸透流の間に確かな関係が確立されている。例えば、同じ V_{oe} は約 25 分間 0.001 % のポリブレンを用いたコーティングと、約 42 分間 0.0005 % のポリブレンを用いたコーティングによって確立することができる。

実施例 3

非重合性 1 級アミンを使用して検査する電気浸透流速

実施例 1 で使用したものと同一キャピラリー電気泳動条件を用いて V_{oe} を上記のように計算した。スペルミン、非重合性 1 級アミンを、0.001 % と 0.005 % の濃度でコーティング剤として使用して、増加する走行時間の V_{oe} への影響を図 8 に示す。図 8 から見られるように V_{oe} はポリブレンに比較してスペルミンを用いると迅速に平らになる (図 6)；これはスペルミンを用いると V_{oe} の検査に対し感度が小さくなることによる。スペルミンのさらに限界は電気泳動緩衝液中のイオンによって除くことができることである。

実施例 4

非重合性 4 級アミンを使用して検査する電気浸透流速

実施例 1 で使用したものと同一キャピラリー電気泳動条件を用いて V_{oe} を上記のように計算した。

D デシルトリメチルアンモニウムプロマイド (DTAB)、非重合性 4 級アミンを、0.15 % の濃度でコーティング剤として使用して、 V_{oe} へのその影響を図 8 に示す。DTAB はスペルミンと同じ限界の一つをもち、ポリブレンに比較して DTAB は迅速に平らになり、従って DTAB を使用する V_{oe} の検査はポリブレンのように感度がよくない。

実施例 5

蛋白質の CE 電気泳動

A. 乳酸デヒドロゲナーゼ

実施例 1 に記載したようにキャピラリー電気泳動を行った。3 種類のイソフォーム (pI = 8.3、8.4、8.55) を含むウサギ筋肉からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 約 2.5 ng を中性マーカー 2.5 nI を添加した 5 mM NaPO₄ 緩衝液 (pH = 7.0) に装填した。ポリブレンコーティングを含まないで中性のマーカーのみがカラムを運って流れるのが見られた。図 10 はキャピラリーをコーティングするポリブレンを含まない場合の走行結果を示し；3.10 分での単一ピークは中性マーカーである。

図 11 は同様の走行結果を示し、ここではキャピラリーチューブを 0.01 % ポリブレンを使用して 10 分間予備コーティングした；この予備コーティングの程度はキャピラリーチューブのオーバーコーティングとなり、キャピラリー表面の負の荷電の反転、および電気浸透流の方向の付随した反転を生じる。電極の極性は蛋白質試料を装填する前に反転した。ポリブレンは電気泳動緩衝液中には存在せず、LDH イソフォームを 2.5 ng 装填した。ポリブレンオーバーコーティングの存在での LDH 走行の結果は図 11 に

示される。17.82、18.19、および20.32でのピークは、それぞれ8.3、8.4および8.55のイソフォームに相当する。19.68の肩は、多分LDHの貯蔵の結果形成されたであろう製剤の汚染を示している。図10と図11の比較から見られるように効果的な分離はキャピラリーをポリブレンで被覆したときLDHを用いて達成することができる。

B. アセチル化ヒストンH4

キャピラリー電気泳動を実施例1に記載したように行った。キャピラリーを5.51 cm/分の電気浸透流速を達成するように上記のようにポリブレンでオーバーコートした。電極の極性は蛋白質を装填する前に反転した。電気泳動緩衝液は10mM Na-クエン酸塩、pH=6.6；走行緩衝液は追加のポリブレンを含まなかった。0~4個のアセチル基を含む多アセチル化ヒストンH4'sを約3.0ng、走行に対して装填した。図12はH4の5種類のアセチル化形態を分析するためのシステムの能力を示す。電気泳動に示されるピークに対応する蛋白質は次の通りである（ピーク/アセチル基の数）：9.01/0；8.87/1；8.64/2；8.4/3；および、8.19/4。コートしなくてもこれら高い塩基性の蛋白質はキャピラリーを移動しないで、キャピラリー表面に引っ張られたままである（データは示されていない）。

実施例6

電気浸透流速の関数としてCEによる蛋白質分離

A. 選択された電気浸透流速に対するキャピラリーチューブ調整。

キャピラリーチューブは5mM Na-P₀ (pH 7.0)緩衝液中0.001%ポリブレンを使用して5分間キャピラリーを予備コートして調整した。

B. 2種類のリボスクレアーゼT1の分離

度の減少になる（17.0 cm/分から13.1 cm/分まで）。DNAピークは260 nmでモニターした。

3ナノグラムのDNA（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーから入手した1 kbラダー）をカラムに装填し、30分の工程でDNAのピークは検出されなかった（図14）。

次にキャピラリーをSB緩衝液プラス10mM NaClを用いて洗浄した。DNAを装填し、走行緩衝液としてSB+10 mM NaClを使用して上記のように実験した。図15から見られるように、次いで複数のDNAピークを30分間の走行中に検出した。キャピラリーをSB緩衝液と20 mM NaClで洗浄した。DNAを装填し、上記のように走行緩衝液としてSB+20 mM NaClを使用して実験した；さらにDNA種を検出した（図16）。これらの2つの図を比較して明かなように特定のDNA種は、この場合、ステップ勾配を用いてイオン交換方法で引き離すことができる。図15と16はピークが鋭くDNAフラグメントが良く分離されることを示している。

実施例8

陰イオン蛋白質のイオン交換キャピラリー電気泳動（IBCE）

キャピラリーの部分コーティングを基本的に実施例7に記載したように10 mM Na-クエン酸塩緩衝液を用いて行った。リボスクレアーゼT1（pI=2.9）と一つの正の荷電によって異なるRNase T1の変種を、真空下、キャピラリーに装填した。キャピラリー電気泳動の条件は実施例1に記載したものと同様であった。図17はその実験結果を示す；4.82でのピークは中性マーカーであり、14.98のスパイクは走行の端部を示す。RNase T1に相関する200nmでの限定できるピークはない。

pH=6.6のRNase T1で変種T1を負に荷電する。キャピラリーを

キャピラリー電気泳動を実施例1で記載したと同様に行った。セクションAで記述した予備コートしたキャピラリーを使用した。走行緩衝液は20mM NaClを添加した5mM Na-P₀ (pH=7)であった；ポリブレンは走行緩衝液に添加しなかった。野生タイプのアスペルギルス・オリヅ (*Aspergillus oryzae*) リボスクレアーゼT1 (RNase T1) とリジン置換に対してグルタミンを有する組換え変種の同量の混合物を調製した；この置換は野生タイプよりも正の荷電のものをもつ変種となる。約2.5ngの蛋白質混合物を装填し25kVで16分間分離を行った。中性のマーカーは6.67のピークによって示される。これらの条件下ではコーティングのロスは何も認められない。

この分離システムの鋭敏な感度はRNase T1の2種に相当する2つの良くははっきりしているピーク（14.26 および15.96；図13）に見られる。非常にシャープなスパイクは走行緩衝液に形成された沈着物に相当する；この沈着物は予備通過によって除去することができるが、その存在は分離に影響を与えない。

実施例7

ポリブレン被覆キャピラリーを使用する0.15%ヒドロキシエチルセルロース中のデオキシリボ核酸の一定電場対向移動キャピラリー電気泳動（CMCE）

DNA試料の装填前にポリブレンを用いてキャピラリーを電気コートして、緩衝液はSB（0.15%ヒドロキシエチルセルロースを含む5mM Na-ホウ酸塩（pH=9））であったこと以外は、キャピラリー電気泳動を実施例1と同様に行った。

電気コーティングの程度を実施例1に記載したようにモニターした。電気コーティングは5分間SB中で、0.001%の濃度でポリブレンを用いて行い、これらの条件下では29%のエンド浸透速

10mM Na-クエン酸塩緩衝液+10mM NaClで洗浄し、さらに蛋白質を用いたとき、2つのピークが現れた。30mM NaClにて最大収量の蛋白質が得られるまで同量の蛋白質を塩濃度の増加と共に装填するとき収率が増加した（図18）。

本発明は特定の具体例、方法および応用に関して記載されているが、高分子の分離を含む他の使用に対し本方法の変更、本方法の応用を本発明から逸脱することなく行うことができることは当業者の認めるところであろう。

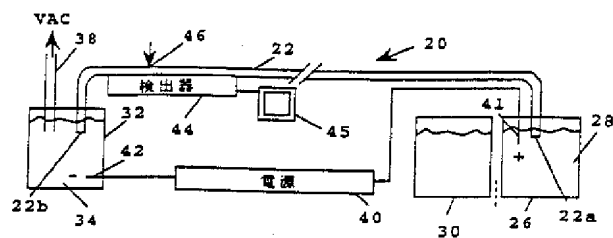


Fig. 1

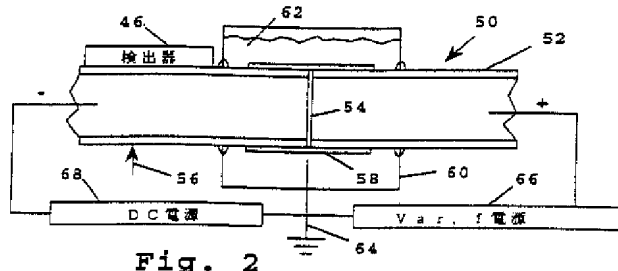


Fig. 2

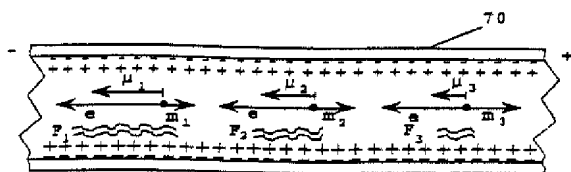


Fig. 3

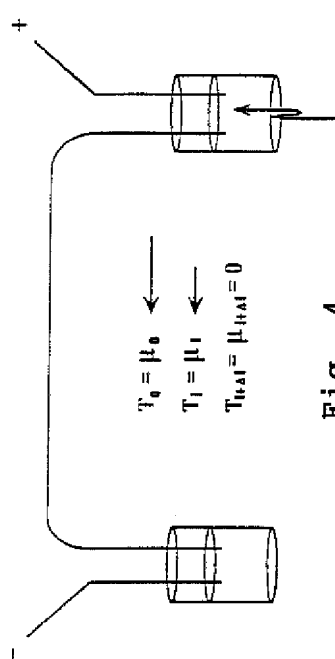


Fig. 4

Fig. 5

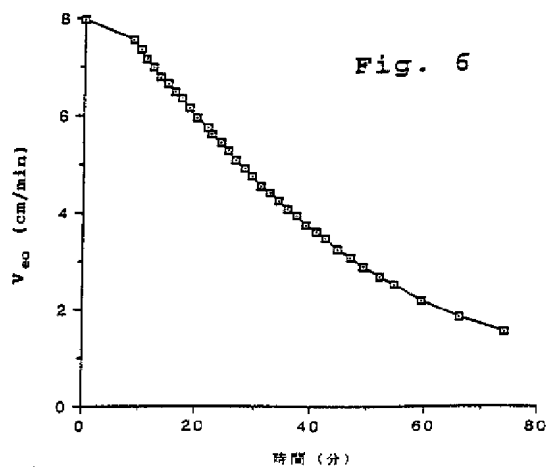
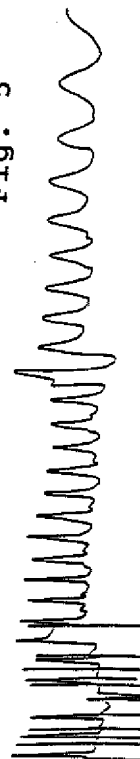


Fig. 6

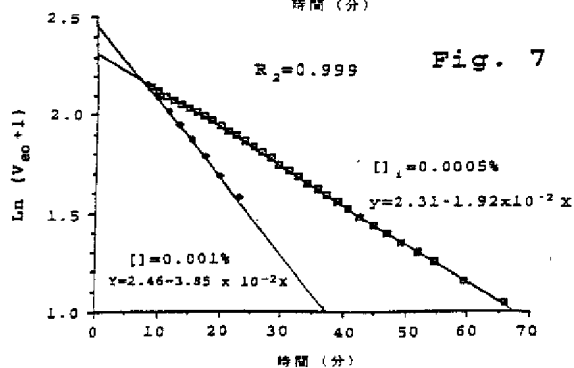


Fig. 7

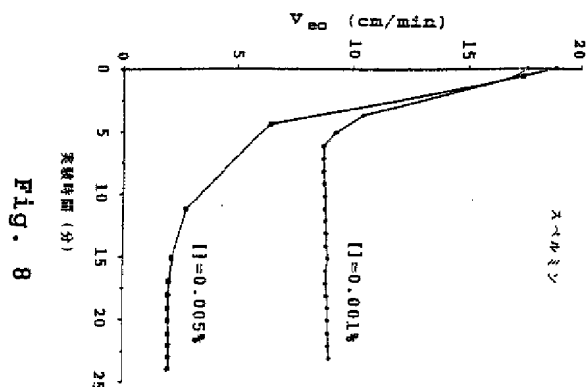


Fig. 8

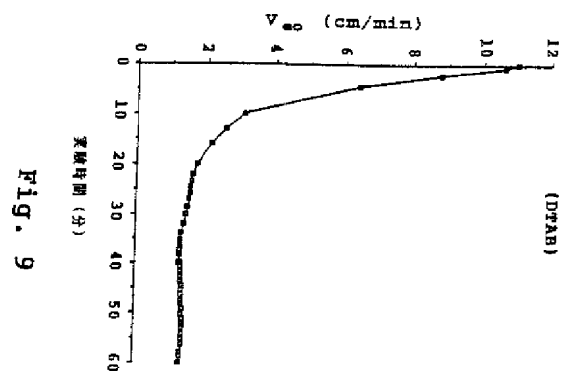
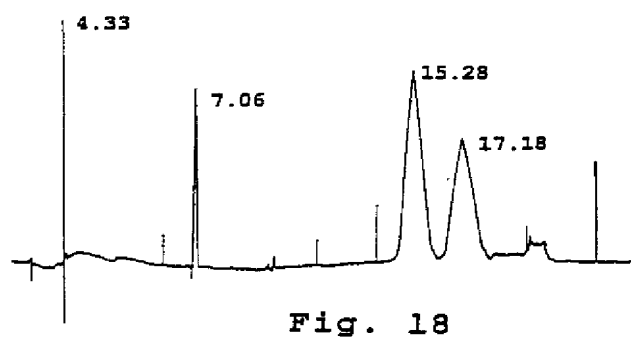
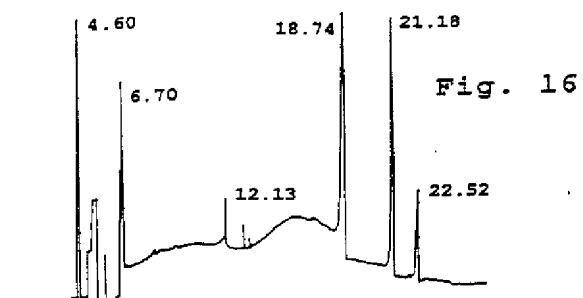
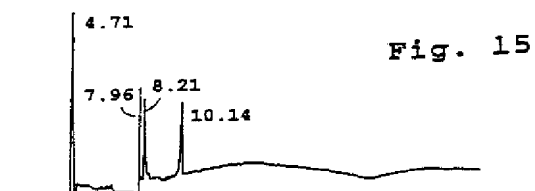
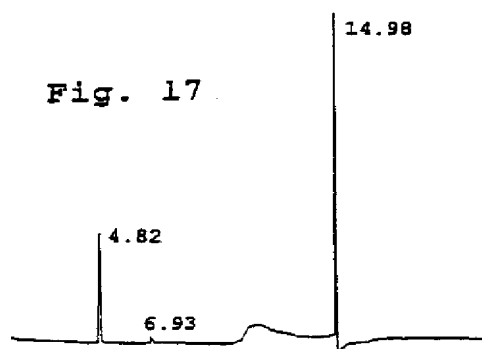
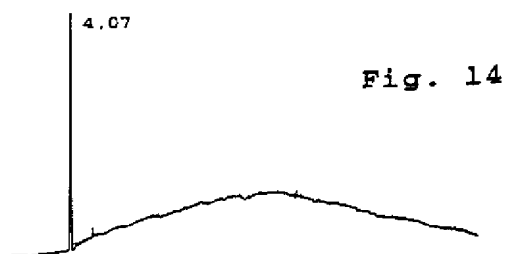
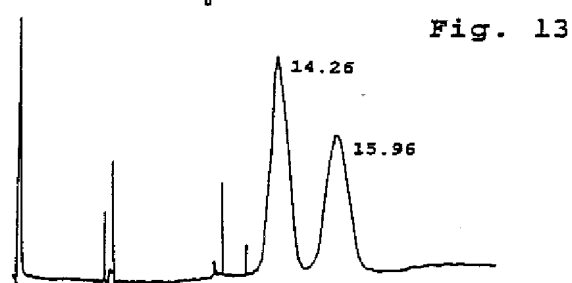
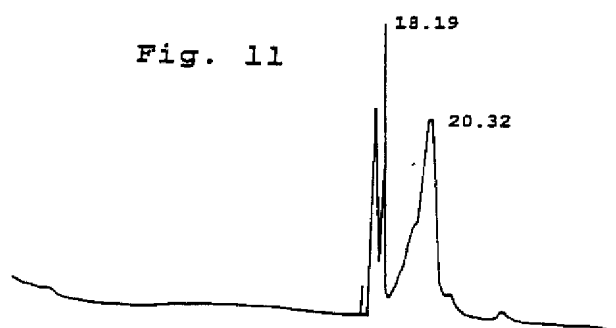
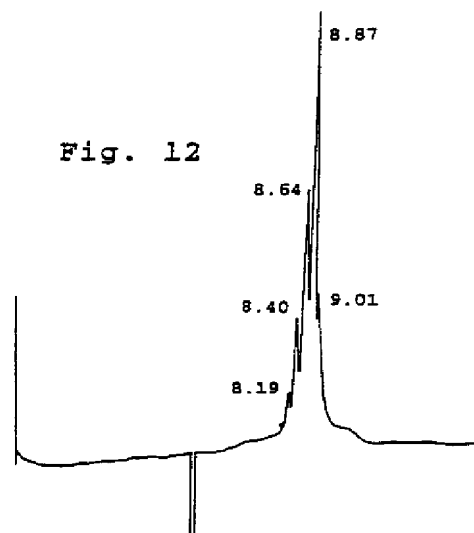
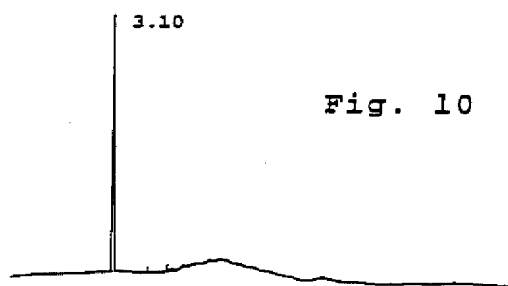


Fig. 9



補正書の翻訳文の提出書(特許法第184条の7第1項)

平成4年5月6日

特許庁長官 殿

1. 国際出願番号 PCT/US90/06435

2. 発明の名称

キャピラリー電気泳動のための流速制御表面荷電コーティング

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404

フォスター シティ、リンカーン センター

ドライブ 850

名 称 アブライド バイオシステムズ インコーポレイテッド

代表者 ジョセフ・エイチ・スミス

国 籍 アメリカ合衆国

4. 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区西新橋一丁目10番1号

正直屋ビルディング6階 電話03(3504)0717番(代表)

氏 名 (8371) 弁理士 舟 橋 榮 子



5. 補正書の提出年月日

1991年4月22日

6. 添付書類の目録

補正書の翻訳文

1 通

4. 前記ポリマーが4級アミン荷電基をもつ疎水性ポリマーである、請求項2記載の方法。
5. ポリマーが、 $[-N^+(R_2)-(CH_2)_n-N^+(R_2)-]$ 、式中のRは(水素、アルキル、アリールまたは官能基のような)側鎖基であり、 $n=2\sim10$ 、およびmはポリマー中に存在する繰り返しの単位の数である、形態のポリマーの群から選ばれる、請求項2記載の方法。
6. ポリマーがヘキサメスリンブロマイドである、請求項4記載の方法。
7. ポリマーが疎水性の分子間の相互作用を形成することができ、ポリマーを含む溶液がさらにこのような疎水性の相互作用を減らすことができる試薬を含む、請求項1記載の方法。
8. 試薬がエチレングリコールである、請求項7記載の方法。
9. 前記印加する工程の後に、チューブ壁からポリマーを除去するために有効な溶液をチューブを通して引き入れる、請求項1記載の方法。
10. ポリペプチドを分離する際に使用するため、前記結合したポリマーがチューブの内壁に正味の正の荷電を与えて、前記印加する間にチューブ中の前記電解質がポリペプチドの等電点以下のpHを持つ、請求項1記載の方法。
11. チューブが正に荷電したアミン基を有し、前記ポリマーがポリスルホン酸、ポリカルボン酸、およびポリリン酸ポリマーからなる群から選ばれる負に荷電したポリマーである、請求項1記載の方法。
12. 核酸種を分離する際に使用するための、請求項11記載の方法。
13. ポリマーが両性イオンポリマーである、請求項1記載の方法。
14. 荷電した表面基を有するキャピラリーチューブ中に選択され

補正された請求の範囲

(1991年4月22日(22.04.91)に国際事務局によって受領された;元の請求の範囲1~20を補正された請求の範囲1~20(5頁)によって置換)

1. 内壁が荷電した表面化学基をもつキャピラリー電気泳動チューブ中の高分子を分離する方法において、その方法が

その荷電がチューブの内壁の化学基の荷電と対向している荷電した化学基で繰り返しのサブユニットを有するポリイオン性ポリマーを含む溶液を、キャピラリーチューブに引き入れ、

前記引き入れによって、ポリマーを含まない電解質のチューブを通して電気浸透移動している間にチューブ壁にポリマーを保持するに十分な結合安定性を持つ非共有化学基の相互作用によってチューブ内壁にポリイオン性ポリマーを結合し、

チューブ表面荷電基が実質的にポリマーに荷電によってマスクされるまで前記引き入れを継続し、

チューブの端部を電解質溶液を含むアノードとカソードの貯蔵器に浸漬し、

分離されるべき高分子を含む試料をチューブの一端に導入し、

チューブの一端からチューブの他端に向かって試料中の高分子を引っ張るように極性作用をもち貯蔵器を横切る電場を印加する工程からなる分離方法。

2. 前記チューブが、アニオンの表面化学基を有し、ポリマー中の繰り返しのサブユニットがカチオンの化学基を含む、請求項1記載の方法。

3. 前記アニオンの表面基がシラン基であり、前記ポリマーが規則的に間隔をあけた、荷電したアミン基を含む、請求項2記載の方法。

た電気浸透流の特性を達成する方法が、

アノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引き入れるとき、チューブの表面荷電を変えることができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する、各工程からなる方法。

15. 前記チューブがアニオン性の表面の化学基を有し、前記化合物が規則的に間隔をあけた、カチオン性の化学基を含むポリマーである、請求項14記載の方法。

16. ポリマーが、 $[-N^+(R_2)-(CH_2)_n-N^+(R_2)-]$ 、式中のRは(水素、アルキル、アリールまたは官能基のような)側鎖基であり、 $n=2\sim10$ 、およびmはポリマー中に存在する繰り返しの単位の数である、形態のポリマーの群から選ばれる、請求項15記載の方法。

17. 荷電した表面基が表面壁に静電的に結合する荷電したコーティング剤の分子の一部依存し、前記化合物が、化合物をチューブを通して引っ張るとき、表面壁からコーティング剤分子の除去を促進するために有効である、請求項14記載の方法。

18. 化合物が、チューブの表面壁に静電的に、そしてそれ自身に疎水的に結合するように働く荷電ポリマー化合物であり、化合物をチューブに引き入れ通すとき、前記引き入れが、表面壁の荷

条約19条に基づく説明書

電が中性となり最初の電気浸透流の方向で電気浸透流が止むまで、この最初の電気浸透流の方向に化合物を引出すことを含み、さらに向かい合った方向で、チューブ内の電気浸透流が選択された速度に達するまで同じ方向にチューブを通して荷電したポリマー化合物を引き入れることを含む、請求項14記載の方法。

19. 核酸種を分離する際に使用するため、前記キャピラリー表面壁が負に荷電した基を有し、前記化合物が疎水性のポリアミンポリマーであり、さらに分離されるべき少なくとも1の種がキャピラリー表面壁のポリマー化合物に結合していないイオン強度の電気泳動媒体中の核酸種を電気泳動により分離する工程を含む、請求項14記載の方法。

20. 荷電した表面基と選択された電気浸透流の特性を有するキャピラリーチューブが、

アノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引っ張るとき、チューブの表面荷電を反転することができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する、

各工程によって調整されたキャピラリーチューブ。

補正された請求の範囲は新しい請求項14と20として元の出願に含まれる2つの独立の請求項を保持する。新しい従属項15は請求項14の方法に使用されるキャピラリーチューブがアニオン表面化学基を有することおよびチューブを通して引っ張られる化合物が規則的に間隔をあけたカチオンの化学基であることに制限を具陳する。この方法の具体例は明細書8頁、22行目～9頁、2行目および16頁、27行目～17頁、18行目（翻訳文明細書8頁、2行目～11行目および15頁、8行目～25行目）で支持される。

新しい請求項5および16のポリマー形態は、元の請求項5にあり、化合物のポリマーの機相に対して変更された。本発明の方法に有用なポリマーの一般的性質に対する支持は明細書16頁、27行目～17頁、18行目（翻訳文明細書15頁、8行目～25行目）に見出される。

新しい独立請求項1、および従属項2～13は明細書中に広く記載されている本発明の機相に関するものである。本発明は高分子、特にポリペプチドと核酸を分離するための方法を限定している。請求項1はこの方法に特に有用な、そしてまた従来技術から区別される本発明の幾つかの要素を列挙している。このような要素の一つはチューブの内壁に非共有的に結合するポリイオンポリマーの使用である。この非共有結合コーティングは、明細書の17頁、22～32行目（翻訳文明細書16頁、1～8行目）に記載されているように、所定の分離に最適である荷電環境を生成するコーティングの量の測定を可能にする。さらに、コーティングの非共有結合の性質はそれを可逆的にし、異なるコーティング条件下に同じキャピラリーチューブの繰り返しの使用を容易にする。

本発明のこれらの後者の機相は特に、国際調査報告に引用され

た、ヒエルテンの米国特許第4,680,201号およびカルガーの米国特許第4,865,706号から区別される。これらの特許に記載されたコーティングは、直接または二官能性試薬を通して、キャピラリーの内壁に共有結合により結合している。さらに、ヒエルテンによって記載された発明のコーティングは電気内包浸透（電気浸透）流の抑制に向けられているが、本発明の具体例はこのタイプの流を活用してキャピラリーチューブ中の分離特性を改良している。

カルガーの米国特許第4,865,707号は、ゲル電気泳動に使用するため、ゲルを含有するマイクロキャピラリーチューブを記載している。このゲルは、チューブの内壁とゲルの両方に共有結合する二官能性試薬を通してキャピラリーチューブの内壁に共有結合することが好ましい。記載された具体例では、二官能試薬コーティングは、共有結合により結合するというよりはむしろ、内壁表面に吸着している；しかし、この具体例は特に不活性の、非荷電物質、例えばテフロン（登録商標）に言及している。チューブのゲル内容物はチューブの試薬コーティングに共有結合している。本発明では、荷電した内表面をもつチューブの使用が好ましく、そして荷電したコーティングは非共有結合の荷電-荷電相互作用を通してチューブの荷電した内表面に結合している。さらに、操作中にそのまま使用されるチューブの内容物はコーティング物質に共有結合しておらず、その結果変化する電気泳動媒体を用いることができる。

国際調査報告

International Application No. PCT/US90/06435

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In general classification symbols only, include sub-classes)			
IPC Class. (Int. Pat. Class.) 204/180.1, 180.7, 181.4, 182.2, 182.8, 183.3, 299R; 427/230			
2. FIELD SEARCHED			
Minimum Documentation Searched:			
Classification System:	Classification Symbols		
U.S.	204/180.1, 180.7, 181.4, 182.2, 182.8, 183.3, 299R; 427/230		
Documentation Searched other than Minimum Documentation: In the extent that such documents are included in the fields searched			
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Character of Document	Date of Document, where appropriate, of the relevant passages	Referred to Class No.
A	US, A, 3,909,380 (DAY)	30 September 1975	1-20
	(See entire document).		
A	US, A, 4,680,201 (HJERTEN)	14 July 1987	1-16
X	(See entire document).		17-20
A	US, A, 4,865,706 (KARGER)	12 September 1989	1-16
X	(See entire document).		17-20
A	US, A, 4,865,707 (KARGER)	12 September 1989	1-16
X	(See entire document).		17-20
<p>* Special categories of cited documents: *</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"X" documents which may have been cited in the international filing date</p> <p>"L" documents which may have been cited in the international filing date or in the national filing date of the applicant, but which are not considered to be of particular relevance</p> <p>"P" documents published prior to the international filing date but after the priority date claimed</p> <p>"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the state of the art or to show the progress of the invention</p> <p>"C" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or claimed as considered to involve an inventive step</p> <p>"V" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a skilled person in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>			
IV. CERTIFICATION			
Date of the Actual Completion of the International Search:		Date of Mailing of this International Search Report:	
04 JANUARY 1991		22 FEB 1991	
International Searching Authority:		Signature of Authorized Officer:	
TSA/US		DAVID G. RYSER	
		INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY	

Form PCT/ISA/210 (Revised March 1989)

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)3月10日

【公表番号】特表平5-503989

【公表日】平成5年(1993)6月24日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-515884

【国際特許分類第6版】

G01N 27/447

B01D 57/02

// C07K 1/26

【F I】

G01N 27/26 315 Z 0275-2J

B01D 57/02 9344-4D

C07K 1/26 9356-4H

G01N 27/26 331 Z 0275-2J

手続補正書

特許庁長官 殿

平成8年2月25日

1. 事件の表示

PCT/US90/06435

平成2年特許願第515884号

2. 発明の名称

キャピラリー電気泳動のための流速制御表面荷電コートイング

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター

シティ、リンカーン センター ドライブ 850

名 称 アプライド バイオシステムズ インコーポレイテッド

代表者 ジョセフ・エイチ・スミス

国 籍 アメリカ合衆国

4. 代理人

〒105 東京都港区西新橋一丁目1番4号

ノアックスビル3階 電話 (3504)0717 番(代表)

(8371) 弁護士 赤 橋 榮 子



5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄

6. 補正の内容

別紙の通り

請求の範囲

1. 内壁が荷電した表面化学基をもつキャピラリー電気泳動チューブ中の高分子を分離する方法において、その方法が

その荷電がチューブの内壁の化学基の荷電と対向している荷電した化学基で繰り返しサブユニットを有するポリイオン性ポリマーを含む溶液を、キャピラリーチューブに引き入れ、

前記引き入れによって、ポリマーを含む高い電解質のチューブを通して電気泳動移動している間にチューブ壁にポリマーを保持するに十分な結合安定性を持つ非共有化学基の相互作用によってチューブ内壁にポリイオン性ポリマーを結合し、

チューブ表面荷電基が実質的にポリマーに荷電によってマスクされるまで前記引き入れを継続し、

チューブの端部を電解質溶液を含むアノードとカソードの貯蔵器に浸漬し、

分離されるべき高分子を含む試料をチューブの一端に導入し、チューブの一端からチューブの他端に向かって試料中の高分子を引っ張るように極性作用をもち貯蔵器を横切る電場を印加する工程からなる分離方法。

2. 前記チューブが、アニオンの表面化学基を有し、ポリマー中の繰り返しサブユニットがカチオンの化学基を含む、請求項1記載の方法。

3. 前記アニオンの表面基がシリル基であり、前記ポリマーが規則的に間隔をあけた、荷電したアミン基を含む、請求項2記載の方法。

4. 前記ポリマーが4級アミン荷電基をもつ疎水性ポリマーである、請求項2記載の方法。

5. ポリマーが、 $(-Y(R_1)(CH_2)_n-R_2(R_3)_2)_m$ 式中のRは、(本

基、アルキル、アリールまたは官能基のような）側鎖基であり、 $n=2\sim10$ 、および m はポリマー中に存在する繰り返しの単位の数である、形態のポリマーの群から選ばれる、請求項2記載の方法。

6. ポリマーがヘキサメスリンポリアミドである、請求項4記載の方法。

7. ポリマーが疎水性の分子間の相互作用を形成することができ、ポリマーを含む溶液があるにこのような疎水性の相互作用を減らすことができる試薬を含む、請求項1記載の方法。

8. 試薬がエチレンジリコールである、請求項7記載の方法。

9. 前記印加する工程の後に、チューブ壁からポリマーを除去するために有効な溶液をチューブを通して引き入れる、請求項1記載の方法。

10. ポリペプチドを分離する際に使用するため、前記結合したポリマーがチューブの内壁に正味の正の荷電を与えて、前記印加する間にチューブ中の前記電解質がポリペプチドの等電点以下の pH を持つ、請求項1記載の方法。

11. チューブが正に荷電したアミノ基を有し、前記ポリマーがポリスルホン酸、ポリカルボン酸、およびポリリン酸ポリマーからなる群から選ばれる負に荷電したポリマーである、請求項1記載の方法。

12. 核酸種を分離する際に使用するための、請求項11記載の方法。

13. ポリマーが陽性イオンポリマーである、請求項1記載の方法。

14. 荷電した表面基を有するキャピラリーチューブ中に選択された電気浸透流の特性を達成する方法が、

アノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1. のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引き入れるとき、チューブの電位電圧を変えることができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する、各工程からなる方法。

15. 前記チューブがアニオン性の表面の化学基を有し、前記化合物が規則的に間隔をあけた、カチオン性の化学基を含むポリマーである、請求項14記載の方法。

16. ポリマーが、 $[-R'(R_2)-(CH_2)_n-N^+(R_3)-]_m$ 、式中の R は（水素、アルキル、アリールまたは官能基のような）側鎖基であり、 $n=2\sim10$ 、および m はポリマー中に存在する繰り返しの単位の数である、形態のポリマーの群から選ばれる、請求項15記載の方法。

17. 荷電した表面基が表面壁に静電気的に結合する荷電したフーディンゲル剤の分子の一部を存在し、前記化合物が、化合物をチューブを通して引っ張るとき、表面壁からフーディンゲル剤分子の除去を促進するために有効である、請求項14記載の方法。

18. 化合物が、チューブの表面壁に静電気的に、そしてそれ自身に疎水的に結合するように備く荷電ポリマー化合物であり、化合物をチューブに引き入れ通すとき、前記引き入れが、表面壁の荷電が中性となり最初の電気浸透流の方向で電気浸透流が止むまで、この最初の電気浸透流の方向に化合物を引出すことを含み、さらに向かい合った方向で、チューブ内の電気浸透流が逆転された速

度に進するまで同じ方向にチューブを通して荷電したポリマー化合物を引き入れることを含む、請求項14記載の方法。

19. 核酸種を分離する際に使用するため、前記キャピラリー表面壁が負に荷電した基を有し、前記化合物が疎水性のポリアミンポリマーであり、さらに分離されるべき少なくとも1の種がキャピラリー表面壁のポリマー化合物に結合していないイオン強度の電気泳動媒体中の核酸種を電気泳動により分離する工程を含む、請求項14記載の方法。

20. 荷電した表面基と選択された電気浸透流の特性を有するキャピラリーチューブが、

アノードとカソードの電解質貯蔵器中にチューブの向かい合った端部を置き、

1. のチューブ端部から他のチューブ端部に向かって電気浸透流を生成するように電場を2個の貯蔵器を横切って印加し、

化合物をチューブを通して引っ張るとき、チューブの表面電圧を変えることができる化合物を、チューブに引き入れて通し、

化合物をチューブに引き入れて通すときチューブ内の電気浸透流速をモニターし、

前記モニターから決定されるように、所定の電気浸透流速をチューブ内に達成するまで、前記化合物をチューブ中に引き入れて通すことを継続する。

各工程によって調製されたキャピラリーチューブ。

T S1/67/ALL

1/67/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0005558090 - Drawing available

WPI ACC NO: 1991-163473/

Improved capillary electrophoresis method - using flow-rate controlled surface-charge coating on capillary tube

Patent Assignee: APPLIED BIOSYSTEMS INC (BIO); PE CORP NY (PEKE);
PERKIN-ELMER CORP (PEKE)

Inventor: WIKTOROWICZ J E

Patent Family (8 patents, 14 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update
US 5015350	A	19910514	US 1989432061	A	19891106	199122 B
WO 1991006851	A	19910516	WO 1990US6435	A	19901106	199122 E
EP 500784	A1	19920902	WO 1990US6435	A	19901106	199236 E
			EP 1991900595	A	19901106	
JP 5503989	W	19930624	JP 1990515884	A	19901106	199330 E
			WO 1990US6435	A	19901106	
EP 500784	A4	19940317	JP 1991507604	A	19910327	199525 E
JP 3044481	B2	20000522	JP 1990515884	A	19901106	200029 E
			WO 1990US6435	A	19901106	
EP 500784	B1	20010912	WO 1990US6435	A	19901106	200155 E
			EP 1991900595	A	19901106	
DE 69033795	E	20011018	DE 69033795	A	19901106	200169 E
			WO 1990US6435	A	19901106	
			EP 1991900595	A	19901106	

Priority Applications (no., kind, date): US 1989432061 A 19891106

Patent Details

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
WO 1991006851	A	EN			
National Designated States,Original: JP					
Regional Designated States,Original: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE					
EP 500784	A1	EN	56	0	PCT Application WO 1990US6435 Based on OPI patent WO 1991006851
Regional Designated States,Original: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE					
JP 5503989	W	JA	13	1	PCT Application WO 1990US6435 Based on OPI patent WO 1991006851
EP 500784	A4	EN			
JP 3044481	B2	JA	17		PCT Application WO 1990US6435 Previously issued patent JP 05503989 Based on OPI patent WO 1991006851
EP 500784	B1	EN			PCT Application WO 1990US6435 Based on OPI patent WO 1991006851
Regional Designated States,Original: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE					
DE 69033795	E	DE			PCT Application WO 1990US6435 Application EP 1991900595 Based on OPI patent EP 500784 Based on OPI patent WO 1991006851

Alerting Abstract US A

Method of achieving selected electroosmotic flow characteristics in a

capillary tube with charged surface gps. comprises (a) placing opposite ends of the tube in anodic and cathodic electrolyte reservoirs; (b) applying an electric field across the two reservoirs to produce electroosmotic flow from one tube end toward the other tube end; (c) drawing into and through the tube, a cpd. (I) capable of stably altering the surface charge of the tube, as (I) is drawn through the tube; (d) monitoring the electroosmotic flow rate within the tube as (I) is drawn into and through the tube; and (e) continuing to draw (I) into and through the tube until a required electro-osmotic flow rate in the tube, as determined from the monitoring is achieved.

USE/ADVANTAGE - The method can be used to optimise electrophoretic sepn. of charged protein or nucleic acid species in a capillary tube and to produce capillary tubes with required charge density properties. The method is both rapid and simple and results in either reversible or irreversible surface charge densities in a capillary electrophoresis (CE) tube. @(-pp

Class Codes

International Classification (Main): G01N-027/26, G01N-027/447

(Additional/Secondary): B01D-057/02, C07K-001/26, C07K-003/14

DWPI Class: A89; B04; D16; J04; S03